

# 产 GL-7-ACA 酰化酶重组菌的构建及高表达研究\*

史莞莞<sup>1</sup> 罗 晖<sup>1\*\*</sup> 于慧敏<sup>2\*\*</sup> 林 海<sup>1</sup> 沈忠耀<sup>2</sup>

(北京科技大学环境工程系 北京 100083) (清华大学化工系 北京 100084)

**摘要** 戊二酰基-7-氨基头孢烷酸(GL-7-ACA)酰化酶是7-氨基头孢烷酸(7-ACA)两步酶法生产中的关键酶。成功构建组成型表达的产GL-7-ACA酰化酶重组大肠杆菌JM105/pMKC-ACY,并对其高表达条件进行了研究,得到了组成简单、廉价的国产培养基配方及操作简便、易于实现工业化的发酵工艺。在优化条件下,上罐补料高密度发酵的酶活高达6668.9 U/L,是优化前的12.4倍,产率最高可达275.5U/(L·h),达到了工业生产的要求。

**关键词** GL-7-ACA酰化酶,7-氨基头孢烷酸,重组大肠杆菌,高表达

中图分类号:Q920.6, Q927, Q789 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0430-04

## Construction and Overexpression Accomplishment of GL-7-ACAacylase in a Recombinant *Escherichia coli*\*

SHI Yuan-Yuan<sup>1</sup> LUO Hui<sup>1\*\*</sup> YU Hui-Min<sup>2\*\*</sup> LIN Hai<sup>1</sup> SHEN Zhong-Yao<sup>2</sup>

(Environmental Engineering Department, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083)

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** Glutaryl-7-aminocephalosporanic acid(GL-7-ACA)acylase is one of the key enzymes received considerable recognition as a biocatalyst for two-step enzymatic production of 7-ACA. A new recombinant *Escherichia coli*, *E. coli* JM105/pMKC-ACY, was constructed and used for the overexpression studies of the GL-7-ACAacylase. The superior culture conditions were figured out. Fed-batch culture of the recombinant strain was further accomplished under the optimized conditions in a 5L fermentor. The GL-7-ACAacylase activity increased to as high as 6668.9 U/L with the highest productivity of 275.5U/(L·h), which was highly promising for the scale-up enzymatic production of 7-ACA in industry.

**Key words** GL-7-ACAacylase, 7-aminocephalosporanic acid, Recombinant *E. coli*, Overexpression

7-氨基头孢烷酸(7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA)是生产头孢菌素类抗生素的重要原料,目前都是由头孢菌素C通过生物酶法或化学法生产。化学法的生产条件苛刻,且在生产过程中用到大量有毒化学物质,对环境造成严重污染。与化学法相比,酶法生产可以使得7-ACA生产过程简化,提高产品的收率和质量的同时减少污染,因此有着不可比拟的优势<sup>[1]</sup>。目前,国外已逐渐采用先进的双酶法催化工艺<sup>[2,3]</sup>,国内基本都还采用化学法生产7-ACA。在酶法工艺中,如何提高D-氨基酸氧化酶和GL-7-ACA酰化酶这两种关键酶的生产能力及其催化活性,是酶法生产7-ACA实现工业化的关键<sup>[1,2]</sup>。在酶法生产7-ACA工艺中,主要通过基因工程来改

变酶的结构,以提高酶的活性和稳定性<sup>[4-6]</sup>。

本文以工业应用为目标,在成功构建组成型表达的重组*E. coli* JM105/pMKC-ACY同时对其高表达条件进行研究,期望得到成本低且易于实现工业化的GL-7-ACA酰化酶高效表达的工艺条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种构建方法

用质粒DNA提取试剂盒提取pMKC-ACY质粒(本课题组构建)<sup>[6]</sup>,转入事先准备好的相应宿主菌的感受态细胞中,37℃温育复苏45min~60min,取100μL涂平板培养(LB培养基,卡那霉素浓度50 μg/mL),37℃培养12~16h,把构建的菌株发酵培

\* 全国优秀博士论文作者专项资助项目(No. 200345)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-62788568, E-mail: lhlhuhui@sina.com, yhm@tsinghua.edu.cn

收稿日期:2006-07-03,修回日期:2006-09-01

养、测酶活,做进一步的筛选。

感受态细胞的制备及转化方法参见文献[7],质粒 DNA 提取试剂盒为北京赛百盛生产。TOP-10F 购于 Invitrogen, TB1 购于 NEB, JM105 和 JM109 为本实验室保存, VG1 为上海生物工程研究中心惠赠。

1.2 菌种培养方法

将 -20℃ 冰箱中保藏的菌种接种到 LB 卡那霉素浓度 50μg/mL 活化斜面上, 37℃ 培养 16h ~ 20 h。将活化后的斜面菌种接入种子培养基, 于 37℃、200 r/min 转速振荡培养 10 ~ 14h, 摇瓶培养实验装液量如无特指, 均为 300 mL 三角瓶中装 50 mL 培养基, 转速 200 r/min。

种子培养基为 LB 液体培养基(卡那霉素浓度 50μg/mL): 蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, 氯化钠 1%, pH 7.0。

1.3 摇瓶发酵培养

转接适量种子菌液至摇瓶发酵培养基(卡那霉素浓度 50 μg/mL), 在不同温度下(25℃ ~ 37℃)继续培育 24h, 温度如无特指, 均为 28℃。

1.4 摇瓶培养基的优化

(1) 碳、氮源的筛选: 碳源: 甘油 0.4%, 葡萄糖 0.4%, 氮源: 国产酵母浸粉(双旋) 1%, 国产酵母浸粉(奥博星) 1%, 国产酵母浸膏(双旋) 1.5%, 进口酵母粉 1%(OXOID), 玉米浆(华北制药) 4%。

(2) 采用正交试验法优化培养基: 采用  $L_{18}(3^7)$  正交试验设计及  $L_9(3^4)$  正交试验设计优化培养基<sup>[8]</sup>。

1.5 培养条件的优化

温度分别考察 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃; 发酵初始 pH 值分别采用 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0; 接种量分别为 0.5%、1%、2.5%、5%; 装液量: 300mL 摇瓶分别装 25mL、50mL、75mL、100mL。

1.6 上罐高密度补料分批发酵

B. Braun 公司的 Biostat. B 5L 发酵罐(装液量 3L)。发酵培养基: 玉米浆 5%、甘油 4%、 $K_2HPO_4$  1.25%、微量元素 0.02%、pH 7.5; 流加料: 玉米浆 150g、甘油 12g、200mL 水; 发酵过程中控制通气量为 1vvm、转速为 600 r/min、温度 29℃, pH 值用 4mol/L 的 NaOH 控制不低于 6.5, 第 5h 开始流加补料, 流加速度为 60 g/h。

1.7 酶活测定方法

见参考文献[5]

2 结果与讨论

2.1 菌种的构建

由于目前人们构建的 GL-7-ACA 酰化酶基因工程菌往往存在需要诱导剂且表达过程中生成较多包涵体等问题, 导致了酶活较低且生产成本较高<sup>[4,5]</sup>。本课题组成成功构建了 GL-7-ACA 酰化酶基因(*Acy*)与麦芽糖结合蛋白基因(*malE*)的融合表达体系, 构建了质粒 pMKC-ACY(质粒部分基因见图 1), 可以实现 GL-7-ACA 酰化酶的组成型表达, 不需使用昂贵的诱导剂 IPTG, 且生成包涵体的现象大大减少。

在此基础上, 本研究对宿主菌进行了进一步筛选, 以组成型表达替代诱导型表达方式, 以增加目标蛋白的可溶性和表达水平, 进一步提高酰化酶的表达活性, 为降低生产成本打下基础。不同宿主重组菌在 LB 培养基中发酵酶活结果见表 1。结果表明, 以 *E. coli* JM105 为宿主时酶活明显优于其它宿主, 因此确定 JM105 为宿主菌, 成功构建了组成型表达的重组大肠杆菌 JM105/pMKC-ACY, 以此进一步进行培养条件的研究。

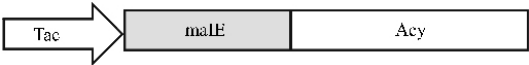


图 1 GL-7-ACA 酰化酶的重组质粒部分基因示意图  
Tac tac 启动子, malE 麦芽糖结合蛋白, Acy GL-7-ACA 酰化酶

2.2 培养基单因素实验

(1) 氮、碳源的筛选: 由于采用 LB 培养基对重组菌的培养, 培养基成本和所得酶活都不利于工业化。本文对几种常用的有机氮源(1.4.1)进行了摇瓶初步筛选。结果发现 4% 玉米浆和 1% 酵母浸粉(国产, 奥博星)较适于 JM105/pMKC-ACY 菌的生长及酶活积累, GL-7-ACA 酰化酶酶活分别达 1458 U/L 和 1445 U/L, 均高于采用进口酵母浸粉和蛋白胨的 LB 培养基。

表 1 宿主菌的筛选

| 宿主菌     | TOP10 | TB1  | JM105 | JM109 | VG1   |
|---------|-------|------|-------|-------|-------|
| 酶活(U/L) | 297.8 | 21.7 | 538.5 | 259.9 | 57.71 |

以0.4%甘油为碳源时重组菌的生物量  $OD_{600}$  和酶活分别为 12.99U/L 和 1031U/L, 远高于 0.4% 葡萄糖为碳源的 9.97U/L 和 516U/L。

因此, 初步选择玉米浆或酵母浸粉(国产, 奥博星)为氮源, 以甘油为碳源。

(2) 其它主要影响因素的确定: 根据本课题组对重组大肠杆菌表达条件的前期研究结果发现, 除主要因素碳、氮源外,  $K_2HPO_4$ 、 $NH_4Cl$ 、 $MgSO_4$  也是培养基配方中经常用到的成分。因此本研究决定把  $K_2HPO_4$ 、 $NH_4Cl$ 、 $MgSO_4$  作为考察的因素。

### 2.3 采用正交实验法优化培养基

在单因素筛选及经验的基础上, 采用正交设计法对发酵培养基做进一步优化。通过对玉米浆、酵母粉、甘油和  $NaCl$ 、 $K_2HPO_4$ 、 $NH_4Cl$ 、 $MgSO_4$  4 种无机盐进行  $L_{18}(3^7)$  正交设计, 分别以酶活  $X$  (U/mL) 和菌浓  $Z$  ( $OD_{600}$ ) 为考察指标, 进行极差分析。结果表明, 玉米浆同时是影响  $X$  和  $Z$  的最主要因素, 浓度为 4% ~ 8% 较为适宜; 甘油是影响  $X$  和  $Z$  的另一个重要因素, 对  $X$  和  $Z$  而言, 甘油的最佳用量均为 0.4%;  $K_2HPO_4$  对  $X$  和  $Z$  也均有较大影响, 其最优浓度为 1% 左右; 酵母浸粉、 $MgSO_4$  和  $NH_4Cl$  在 0% 时酶活最高;  $NaCl$  浓度在 0% ~ 1% 之间对  $X$  和  $Z$  的影响均不大, 也可以不作考虑。 $L_{18}(3^7)$  正交实验给出的培养基组成为: 玉米浆(4% ~ 8%)、甘油 0.4%,  $K_2HPO_4$  (1%)。

在以上  $L_{18}(3^7)$  正交实验方案及结果的基础上, 进一步缩小玉米浆、甘油和  $K_2HPO_4$  的水平范围并同时考察微量元素( $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $FeSO_4$ ) 对发酵的影响。设计进行  $L_9(3^4)$  正交实验, 仍然以酶活  $X$  (U/mL) 和菌浓  $Z$  ( $OD_{600}$ ) 为考察指标, 实验极差分析表明,  $K_2HPO_4$  对  $X$  影响最大, 在 1.25% 时  $X$  最高, 对  $Z$  影响不大; 玉米浆和甘油的最优浓度分别为 5% 和 0.4%; 微量元素在 0.02% 时  $X$  和  $Z$  均为最高。

通过单因素及  $L_{18}(3^7)$  和  $L_9(3^4)$  正交优化设计结果, 得到廉价的优化培养基为: 玉米浆 5%、甘油 0.4%、 $K_2HPO_4$  1.25%、微量元素 0.02%。优化过程中摇瓶发酵最高酶活 2473.1 U/L, 是优化前的 4.6 倍。

### 2.4 培养条件的研究

**2.4.1 温度对发酵的影响** 温度对菌体生长及酶的表达有很大的影响。由图 2 可见, 当温度处于较低温度 25℃ 时菌体生长及酶活积累缓慢, 28℃ ~ 37℃ 菌体生长基本相同, 但是, 在 28℃ 时 GL-7-ACA 酰化酶的表达量最高, 28℃ ~ 31℃ 较稳定, 高于 31℃ 时则随温度升高而降低。因此, 在发酵过程中应控制发酵温度为 28℃ ~ 31℃。

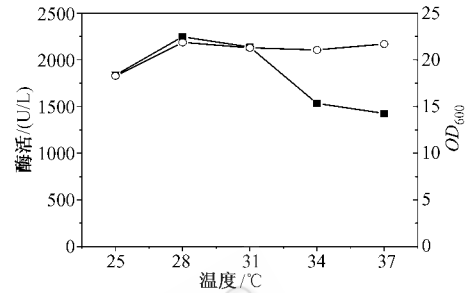


图2 温度对发酵的影响

—■— 酶活 (U/L) —○—  $OD_{600}$

**2.4.2 初始 pH 值对发酵的影响** 在不同初始 pH 值下对 JM105/pMKC-ACY 进行摇瓶发酵培养, 结果见图 3。由图 3 可见, 初始  $pH \leq 6$  时, 菌体生长及酶活积累均受到严重抑制, 随着 pH 升高, 抑制被逐渐解除,  $pH 7.0 \sim 8.5$  时, 菌体生长达最大值, 酶活积累随 pH 升高而升高, 说明在初始 pH 值偏碱性的条件下有利于菌体生长及酶活积累。种子发酵液接种时 pH 约为 7.5, 为了减短迟滞期, 采用初始  $pH 7.5$  比较合适。

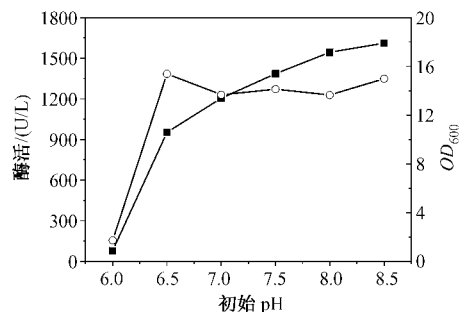


图3 初始 pH 值对发酵的影响

—■— 酶活 (U/L) —○—  $OD_{600}$

**2.4.3 接种量对发酵的影响** 为了确定最佳的接种量, 选取 0.5%、1%、2.5%、5% 等 4 个不同的接种量水平考察对重组菌的影响。由图 4 可见, 接种量为 2.5% 时, 菌体生长和酶活积累均为最高。

**2.4.4 装液量对发酵的影响** 在摇瓶发酵过程中,

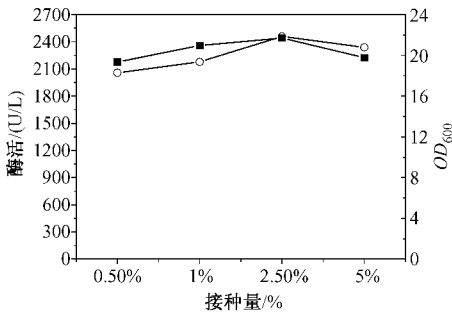


图4 不同接种量对发酵的影响

—■—酶活 (U/L) —○— OD<sub>600</sub>

通过改变装液量来考察溶氧对菌体生长及 GL-7-ACA 酰化酶表达的影响。由图 5 可见,随着装液量的增加,菌体生长及酶活积累都呈现下降趋势,即较高的溶氧水平有利于菌体生长和酶活积累,因此选择较低的摇瓶装液量 25mL~50mL/300mL 比较适宜;上罐发酵时也应适当提高通氧量。

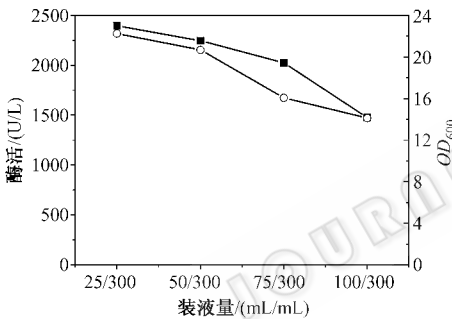


图5 装液量对发酵的影响

—■—酶活 (U/L) —○— OD<sub>600</sub>

## 2.5 上罐补料分批发酵

在正交实验优化得到的培养基及上面考察的各种影响条件的基础上,在 5L 发酵罐中进行了重组大肠杆菌 JM105/pMKC-ACY 的补料发酵研究(发酵条件见 1.6)。由图 6 可见,在此优化发酵条件下菌体生长能够很快进入对数生长期,OD<sub>600</sub> 在 23.5h 达最高值 50.2。酶活随生物量的增加而快速积累,23.5h 达 6473.1 U/L,此时产率达最高 275.5 U/(L·h)之后的 6h 积累较为缓慢,29.5h 酶活达到最高 6668.9 U/L。

从工业应用和经济角度考虑出发,23.5h 时菌浓和酶活均已达较高值,能够满足工业应用的需

要,因此可在 23.5h 左右终止发酵。

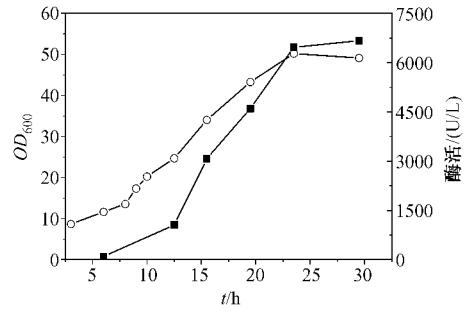


图6 上罐流加补料分批发酵结果

—■—酶活 (U/L) —○— OD<sub>600</sub>

## 3 结论

本研究成功构建的组成型高表达 GL-7-ACA 酰化酶的重组大肠杆菌 JM105/pMKC-ACY,同目前同类产 GL-7-ACA 酰化酶菌株比较,具有无需加诱导剂诱导,增加了目标蛋白的可溶性和表达水平等优势。从工业应用和降低成本角度出发,优化得到廉价的国产化培养基并得到一系列的优化条件。在此基础上,将重组菌在 5L 发酵罐中进行流加补料发酵,GL-7-ACA 酰化酶酶活在 23.5 小时即可达到 6473.1U/L,产率高达 275.5U/(L·h),酶活最高可达 6668.9U/L(是优化前的 12.4 倍),优于目前国内报道的最高酶活 3919.03U/L<sup>[9]</sup>,达到了工业化应用的要求,为我国实现酶法生产 7-ACA 打下基础。

## 参考文献

- [1] 罗 晖,李 强,沈忠耀,等.现代化工 2002,22(12):18~22.
- [2] Conlon H D, Baqai J, Baker K, et al. Biotechnol Bioeng, 1995, 46(6):510~513.
- [3] Nikolov A, Danieleesson B. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(12): 1031~1046.
- [4] Luo H, Yu HM, Li Q, et al. Tsinghua Sci Tech 2005, 10(5): 529~534.
- [5] 罗 晖,胡晓佳,沈忠耀,等.微生物学通报,2004,31(4):38~42.
- [6] Zhou H, Yu H M, Luo H, et al. Enzyme Microb Technol, Accepted.
- [7] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,2003,12:98~100.
- [8] 北京大学数学力学系概率统计组.正交设计法.北京:石油工业出版社,1976,9:1~35.
- [9] 胡爱红,莫章桦.生命科学研究,2004,8(1):89~91.